

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETIL ASETAT
KELOPAK ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa* Linn) TERHADAP
Propionibacterium acne, *Staphylococcus aureus*, DAN
Escherichia coli SERTA UJI BIOAUTOGRAFI**

SKRIPSI



Oleh:

**ARI SUKMAWATI MAKNA TIRTA
K 100 060 200**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2010**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang dari waktu ke waktu terus berkembang. Infeksi merupakan penyakit yang dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain, dari hewan ke manusia. Infeksi disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri, virus, riketsia, jamur dan protozoa. Contoh beberapa bakteri yang dapat menyebabkan infeksi diantaranya *Propionibacterium acne*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* (Gibson, 1996).

Jerawat (*acne vulgaris*) merupakan penyakit kulit yang menyerang pilosebacea kulit yaitu bagian kelenjar sebacea dan folikel rambut. Pembentukan jerawat terjadi karena adanya penyumbatan folikel oleh sel-sel kulit mati, sebum, dan peradangan yang disebabkan oleh *Propionibacterium acne* pada folikel sebacea (West *et al.*, 2005). Pengobatan jerawat dilakukan dengan cara memperbaiki abnormalitas folikel, menurunkan produksi sebum, menurunkan jumlah koloni *P. acne* dan menurunkan inflamasi pada kulit. Populasi bakteri *P. acne* dapat diturunkan dengan memberikan suatu zat antibakteri seperti eritromisin, klindamisin dan benzoil peroksida (Wyatt *et al.*, 2001).

Staphylococcus merupakan penyebab infeksi piogenik (menghasilkan pus) pada manusia dan paling sering terjadi. *Staphylococcus* dapat menyebabkan

sepsis pada luka bedah, abses payudara pada ibu-ibu, mata lengket, dan lesi-lesi kulit pada bayi (Gibson, 1996).

Selain *S. aureus* dan *P. acne* bakteri lain yang sering menimbulkan masalah adalah *Escherichia coli*. *E. coli* secara alami hidup dalam saluran pencernaan. Infeksi *E. coli* dapat menyebabkan infeksi saluran kencing yang merupakan infeksi terbanyak (80%) gastroenteritis, meningitis pada bayi, infeksi lokal, kolesistitis, dan syok bakterimia karena masuknya organisme ke dalam darah dari uretra, kateterisasi atau sistokopi, atau dari daerah septis pada abdomen atau pelvis (Gibson, 1996).

Dewasa ini penggunaan antibiotik sangat banyak terutama dalam pengobatan yang berhubungan dengan infeksi. Walaupun telah banyak antibiotik ditemukan, kenyataan menunjukkan bahwa masalah penyakit terus berkelanjutan. Hal tersebut terjadi akibat pergeseran pada bakteri penyebab penyakit dan perkembangan resistensi bakteri terhadap antibiotik. Karena berkembangnya populasi bakteri yang resisten, maka antibiotik yang pernah efektif untuk mengobati penyakit-penyakit tertentu kehilangan nilai kemoterapeutiknya (Pelczar dan Chan, 1988).

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Salah satu khasiat kelopak rosella adalah sebagai antibakteri (Widyanto dan Anne, 1999). Telah dilakukan penelitian sebelumnya uji sitotoksik dan aktivitas antibakteri ekstrak metanol terhadap kelopak rosella. Pada uji aktivitas antibakteri kandungan yang berkhasiat sebagai antibakteri pada tanaman ini antara lain glikosida jantung, flavonoid, saponin, dan

alkaloid. Kelopak rosella memperlihatkan aktivitas antibakteri dengan *minimum inhibitory concentration* (MIC) $0,30 \pm 0,2 - 1,30 \pm 0,2$ mg/ml terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia mascences*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescence* dengan metode *disc-diffusion* (Olaleye, 2007).

Dalam penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap *Propionibacterium acne*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan metode dilusi padat. Untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang bertanggung jawab sebagai antibakteri, kelopak rosella dapat disari dengan berbagai penyari, dari penyari yang sifatnya non polar (heksana), semi polar (etil asetat), dan polar (air). Pada penelitian ini dilakukan maserasi bertingkat berdasarkan kepolarannya. Penyari yang digunakan untuk maserasi bertingkat yaitu heksana, kloroform, etil asetat, dan air. Maserasi dengan etil asetat diharapkan dapat menyari senyawa-senyawa bersifat semi polar.

B. Perumusan Masalah

1. Apakah ekstrak etil asetat kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. acne*, *S. aureus*, dan *E. coli*?
2. Senyawa kimia apa yang terkandung di dalam ekstrak etil asetat kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menentukan aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap *P. acne*, *S. aureus*, dan *E. coli* dengan metode dilusi padat.
2. Menentukan senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak etil asetat kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dengan cara bioautografi.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn)

a. Sistematika

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Bangsa : Malvales

Suku : Malvaceae

Marga : Hibiscus

Jenis : *Hibiscus sabdariffa* Linn (Widyanto dan Anne, 2000).

b. Kandungan

Berbagai kandungan yang terdapat dalam tanaman rosella membuatnya populer sebagai tanaman obat tradisional. Selain mengandung vitamin C kelopak rosella mengandung flavonoid, gosipetin, antosianin, glukosida hibisin, fosfor,

besi, asam organik, asam amino essensial (lisin dan arginin), polisakarida, dan omega-3 (Widyanto dan Anne, 2000).

c. Manfaat kelopak rosella

Kelopak bunga, daun, dan bijinya berkhasiat untuk melancarkan air seni, antisariawan, dan pereda nyeri. Kelopak bunga rosella mempunyai efek farmakologis yang cukup lengkap, seperti diuretik, antelmintik, antibakteri, antiseptik, antiradang, menurunkan panas, mencegah gangguan jantung, kanker darah, dan menstimuli gerak peristaltik usus. Daunnya dapat mengobati pematangan bisul dan melembutkan kulit (Widyanto dan Anne, 2000).

2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah penarikan zat aktif yang diinginkan dari bahan mentah obat menggunakan pelarut yang dipilih sehingga zat yang diinginkan akan larut. Pemilihan sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus berdasarkan kemampuannya dalam melarutkan jumlah yang maksimal dari zat aktif dan seminimal mungkin bagi unsur yang tidak diinginkan (Ansel, 1989).

Ada beberapa metode dasar ekstraksi yang dipakai untuk penyarian diantaranya yaitu maserasi, perkolasi, sokletasi, dan refluks. Penelitian terhadap metode tersebut disesuaikan dengan kepentingan dalam memperoleh sari yang baik (Anonim, 1986).

Pada penelitian ini menggunakan maserasi bertingkat dari non polar ke polar. Maserasi adalah cara ekstraksi yang sederhana. Maserasi merupakan proses merendam bahan simplisia yang telah dihaluskan dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan terlarut

(Ansel, 1989). Selama proses maserasi, bahan direndam dalam wadah bermulut lebar, ditutup rapat, disimpan dalam waktu tertentu dalam ruang yang gelap dan sesekali diaduk. Metode ini memiliki keuntungan yaitu cara pengerjaannya yang mudah, alat yang digunakan sederhana, cocok untuk bahan yang tidak tahan pemanasan namun pelarut yang digunakan cukup banyak (Anonim, 1986).

3. Bakteri Uji

a. *Propionibacterium acne* (*P. acne*)

Klasifikasi *Propionibacterium acne*

Kingdom : Bacteria

Phylum : Actinobacteria

Classis : Actinobacteridae

Ordo : Actinomycetales

Familia : Propionibacteriaceae

Genus : Propionibacterium

Spesies : *Propionibacterium acne* (Brook dkk, 2005).

P. acne termasuk dalam kelompok bakteri Corynebacteria. Bakteri ini termasuk flora normal kulit. *P. acne* berperan pada patogenesis jerawat dengan menghasilkan lipase yang memecah asam lemak bebas dari lipid kulit. Asam lemak ini dapat mengakibatkan inflamasi jaringan ketika berhubungan dengan sistem imun dan mendukung terjadinya akne.

P. acne termasuk bakteri yang tumbuh relatif lambat. Bakteri ini tipikal bakteri anaerob Gram positif yang toleran terhadap udara. Genom dari bakteri ini telah dirangkai dan sebuah penelitian menunjukkan beberapa gen yang dapat

menghasilkan enzim untuk meluruhkan kulit dan protein, yang mungkin immunogenik (mengaktifkan sistem kekebalan tubuh) (West *et al.*, 2005).

Ciri-ciri penting dari bakteri *P. acne* adalah berbentuk batang tak teratur yang terlihat pada pewarnaan Gram positif. Bakteri ini dapat tumbuh di udara dan tidak menghasilkan endospora. Bakteri ini dapat berbentuk filamen bercabang atau campuran antara bentuk batang atau filamen dengan bentuk kokoid. *P. acne* memerlukan oksigen mulai dari aerob atau anaerob fakultatif sampai ke mikroerofilik atau anaerob. Beberapa bersifat patogen untuk hewan dan tanaman (Brook dkk., 2005).

Akne terjadi ketika lubang kecil pada permukaan kulit yang disebut pori-pori tersumbat. Pori-pori merupakan lubang bagi saluran yang disebut folikel, yang mengandung rambut dan kelenjar minyak. Biasanya, kelenjar minyak membantu menjaga kelembaban kulit dan mengangkat sel kulit mati. Ketika kelenjar minyak memproduksi terlalu banyak minyak, pori-pori akan banyak menimbun kotoran dan juga mengandung bakteri (Anonim, 2007).

Mekanisme terjadinya jerawat adalah bakteri *P. acnes* merusak stratum corneum dan stratum germinativum dengan cara menyekresikan bahan kimia yang menghancurkan dinding pori. Kondisi ini dapat menyebabkan inflamasi. Asam lemak dan minyak kulit tersumbat dan mengeras. Jika jerawat disentuh maka inflamasi akan meluas sehingga padatan asam lemak dan minyak kulit yang mengeras akan membesar (Anonim, 2007).

Terapi jerawat secara farmakologi dapat menggunakan antibiotik secara topikal. Antibiotik yang biasa digunakan untuk mengobati peradangan pada jerawat adalah eritromisin, klindamisin, dan benzoil peroksida (West *et al.*, 2005).

b. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Kingdom : Prokaryotae

Divisi : Protophyta

Subdivisio : Schizomycetea

Classis : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Familia : Micrococcaceae

Genus : Staphylococcus

Species : *Staphylococcus aureus* (Salle, 1961).

S. aureus termasuk dalam golongan bakteri Gram positif yang tidak bergerak aktif dan tidak membentuk spora, sel berbentuk bola dengan diameter kira-kira 1 μm . Biasanya tersusun dalam kelompok-kelompok atau gerombolan yang menyerupai buah anggur. Kuman ini mudah tumbuh pada berbagai pembenihan bakteriologi baik dalam keadaan aerobik atau mikroaerobik dan menghasilkan pigmen yang bervariasi dari putih sampai kuning tua (Jawetz *et al.*, 1991).

Sifat khas *S. aureus* yang digunakan untuk membedakan dari Staphylococcus lain adalah *S. aureus* dapat memfermentasi manitol, mampu menghasilkan enzim koagulase dan endokulase serta menghasilkan enterotoksin,

sedangkan yang lain tidak. *S. aureus* mudah tumbuh pada kebanyakan pembenihan bakteriologi dalam keadaan aerobik atau mikroaerobik. Bakteri ini tumbuh paling cepat pada suhu 37° C, tapi paling baik membentuk pigmen pada suhu kamar (20°C). Koloni *S. aureus* pada pembenihan padat berbentuk bulat halus menonjol berkilau-kilauan, membentuk pigmen berwarna kuning emas (Jawetz *et al.*, 1991).

S. aureus mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik. Antigen ini merupakan kompleks peptidoglikan asam teikhoat yang dapat menghambat fagositosis, dan bagian ini yang diserang bakteriofaga. *S. aureus* bersifat lisogenik karena mengandung faga yang tidak berpengaruh pada dirinya sendiri, tetapi menyebabkan lisis pada anggota dari spesies yang sama (Warsa, 1994).

S. aureus dapat menyebabkan penyakit karena kemampuannya melakukan pembelahan dan menyebar luas ke dalam jaringan. *S. aureus* dapat menyebabkan infeksi baik pada manusia maupun hewan. *S. aureus* ditemukan sebagai bakteri flora normal pada kulit dan selaput lendir manusia. Setiap jaringan tubuh yang terinfeksi oleh *S. aureus*, menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda khas yaitu peradangan dan pembentukan abses (Warsa, 1994).

Penyakit yang disebabkan oleh *S. aureus* antara lain pneumonia, meningitis, endokarditis, dan infeksi kulit. Beberapa antibiotik yang dapat digunakan untuk menghambat *S. aureus* antara lain ampicilin, penisilin, tetrasiklin, kloksasilin, sefalosporin, vankomisin, dan metisilin (Jawetz *et al.*, 2005).

c. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Klasifikasi dari *E. coli* sebagai berikut :

Kingdom	: Prokaryotae
Divisio	: Protophyta
Sub divisi	: Schizomycetea
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacterials
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Spesies	: <i>Escherichia coli</i> (Salle, 1961).

Enterobacteriaceae adalah kelompok besar batang Gram negatif yang heterogen, yang habitat alaminya adalah saluran usus manusia dan hewan. Famili ini mencakup banyak genus misalnya, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, dan *Proteus* (Jawetz *et al.*, 2005). Bakteri ini berbentuk kokobasil (batang pendek), Gram negatif, ukuran 0,4-0,7 μm (Anonim, 1994), serta dapat membentuk koloni rantai panjang (Jawetz *et al.*, 2005). *E. coli* membentuk koloni bulat konveks, halus dengan pinggir-pinggir yang nyata (Jawetz *et al.*, 1991).

Dinding sel bakteri ini terdiri lapisan murein, lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida. Lapisan murein-lipoprotein membentuk 20% dari total dinding sel. Lapisan fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida membentuk 80% dari dinding sel. Komponen utama yang terpenting dari dinding sel adalah lapisan lipopolisakarida, terdiri dari rantai polisakarida yang spesifik, menentukan

sifat antigenik dan aktifitas endotoksin. Permukaan sel bakteri berfungsi untuk perlekatan bakteri pada mukosa usus (Anonim, 1994).

E. coli adalah kuman oportunistik yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Sifatnya unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak-anak dan *travelers diarrhea*, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus (Karsinah dkk., 1994). Di dalam usus kuman ini tidak menyebabkan penyakit, malahan dapat membantu fungsi normal dan nutrisi. Organisme ini menjadi patogen hanya bila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan khususnya saluran air kemih, saluran empedu, paru-paru, peritoneum, atau selaput otak, menyebabkan peradangan pada tempat-tempat tersebut. Beberapa antibiotik yang dapat digunakan untuk pengobatan adalah sulfonamida, fluoroquinolon, dan aminoglikosida. Resistensi terhadap berbagai obat merupakan hal wajar dan di bawah kontrol plasmid yang dapat ditransmisikan (Jawetz *et al.*, 1991).

4. Antibakteri

Antibakteri adalah zat atau senyawa kimia yang digunakan untuk memusnahkan bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Berdasarkan sifat toksisitas selektif (daya kerjanya), ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba dikenal sebagai aktivitas bakterostatik, dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Konsentrasi minimal yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya

dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakteriosid bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KBM (Setyabudy dan Gan, 1995).

Target mekanisme antibakteri adalah sebagai berikut:

a. Kerusakan pada dinding sel

Struktur dinding sel dapat rusak dengan cara menghambat pembentukannya atau setelah selesai terbentuk. Antibiotik yang bekerja dengan mekanisme ini diantaranya adalah penisilin. Penisilin menghambat pembentukan dinding sel bakteri, dengan cara digabungkannya asam N-asetil muramat yang dibentuk dan diadukan sel ke dalam struktur mukopeptida biasanya memberi bentuk baku pada dinding sel bakteri (Pelczar dan Chan, 1988).

b. Perubahan permeabilitas sel

Membran sitoplasma mempertahankan bagian-bagian tertentu dalam sel serta mengatur aliran keluar masuknya bahan-bahan lain, kemudian memelihara integritas komponen-komponen seluler. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel (Jawetz *et al.*, 2005).

c. Perubahan molekul protein dan asam nukleat

Hidup suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu antibakteri dapat mengubah keadaan ini dengan mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat sehingga merusak sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Pelczar dan Chan, 1988).

d. Penghambatan kerja enzim

Sulfonamid merupakan zat kemoterapi sintesis yang bekerja dengan cara bersaing dengan PABA, sehingga dapat menghalangi sintesis asam folat yang

merupakan asam esensial yang berfungsi dalam sintesis purin dan pirimidin. Dengan demikian karena tidak adanya enzim, maka aktivitas seluler yang normal akan terganggu (Jawetz *et al.*, 2005).

e. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein.

DNA, RNA, dan protein memegang peranan amat penting didalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan sel atau pada fungsi sel zat-zat tersebut mengakibatkan kerusakan total pada sel (Jawetz *et al.*, 2005).

Resistensi sel mikroba ialah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel mikroba oleh antimikroba. Sifat ini merupakan suatu mekanisme alamiah untuk bertahan hidup (Anonim, 1994). Resistensi dibagi dalam tiga kelompok, yaitu kelompok resistensi genetik, resistensi non genetik, dan resistensi silang.

1) Resistensi non genetik

Bakteri dalam keadaan istirahat (inaktivitas metabolik) biasanya tidak dipengaruhi oleh antimikroba. Bila berubah menjadi aktif kembali, mikroba kembali bersifat sensitif terhadap antimikroba. Keadaan ini dikenal sebagai resistensi non genetik (Jawetz *et al.*, 2005).

2) Resistensi genetik

Terjadinya resistensi kuman terhadap antibiotik umumnya terjadi karena perubahan genetik. Perubahan genetik bisa terjadi secara kromosomal dan ekstra kromosomal.

a) Resistensi kromosomal

Ini terjadi akibat mutasi spontan pada lokus yang mengendalikan kepekaan terhadap obat antimikroba yang diberikan.

b) Resistensi ekstrakromosomal (resistensi dipindahkan)

Bakteri sering mengandung unsur-unsur genetik ekstrakromosom yang dinamakan plasmid. Bahan genetik dan plasmid tersebut dapat dipindahkan melalui mekanisme transduksi, transformasi, konjugasi, dan translokasi DNA (Jawetz *et al.*, 2005).

3) Resistensi silang

Mikroorganisme yang resisten terhadap suatu obat tertentu dapat pula resisten terhadap obat-obat lain yang memiliki mekanisme kerja yang sama (Jawetz *et al.*, 2005), atau dengan struktur kimia yang hampir sama (Anonim, 1994).

5. Uji aktivitas antibakteri

Pengaruh potensi antibakteri dari suatu zat dapat dilakukan dengan cara:

a. Dilusi cair atau dilusi padat

Pada prinsipnya antibakteri diencerkan sampai diperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi obat ditambah suspensi kuman dalam media. Sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar, kemudian ditanami bakteri. Metode dilusi cair adalah metode untuk menentukan konsentrasi minimal dari suatu antibakteri yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme. Konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya

kekeruhan disebut Kadar Hambat Minimal (KHM) atau *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) (Anonim, 1993).

b. Difusi

Prinsip metode yaitu uji potensi yang berdasarkan pengamatan luas daerah hambatan pertumbuhan bakteri karena berdifusinya antibakteri dari titik awal pemberian ke daerah difusi. Dalam metode difusi ini ada beberapa cara, yaitu:

1) Cara Kirby Bauer

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasikan 5-8 jam pada 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Kemudian diletakkan kertas samir (*disk*) yang mengandung antibakteri di atasnya, diinkubasikan pada 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca:

- a) Zona radikal yaitu suatu daerah di sekitar disk di mana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibakteri diukur dengan mengukur diameter dari zona radikal.
- b) Zona irradikal yaitu suatu daerah di sekitar disk dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri, tetapi tidak dimatikan (Anonim, 1993).

2) Cara Sumuran

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam pada media agar

diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasikan 5-8 jam pada 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standar konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasnya tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Media agar dibuat sumuran diteteskan larutan antibakteri, diinkubasikan pada 37°C selama 18-24 jam. Hasilnya dibaca seperti cara Kirby Bauer (Anonim, 1993).

3) Cara Pour Plate

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam pada media agar diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 ml BHI cair, diinkubasikan 5-8 jam pada 37°C. Suspensi ditambah aquadest steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standart konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml. Suspensi bakteri diambil satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 4 ml agar base 1,5% yang mempunyai suhu 50°C. Setelah suspensi kuman tersebut homogen, dituang pada media agar Mueller Hinton, ditunggu sebentar sampai agar tersebut membeku, diletakkan disk diatas media dan dieramkan selama 15-20 jam dengan temperatur 37°C. Hasilnya dibaca sesuai standar masing-masing antibakteri (Anonim, 1993).

6. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan fisika kimia. Lapisan yang dipisahkan terdiri atas bahan struktur-struktur (fase diam), diletakkan pada penyangga berupa plat gelas, logam, lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan, ditotolkan berupa bercak. Setelah pekat, lapisan diletakkan di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan

pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama pembuatan kapiler (pengembangan). Selanjutnya senyawa yang tidak berwarna dideteksi (Stahl, 1985).

Fase diam dalam Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah bahan penyerap yang umumnya silika gel, alumunium oksida, selulosa, dan turunannya serta poliamida (Sudjadi, 1988). Pemisahan fase gerak baik tunggal maupun campuran tergantung solut yang dianalisis dan fase diam yang digunakan. Bila fase diam telah ditentukan maka memilih fase gerak dapat berpedoman pada kekuatan elusi fase gerak tersebut (Sumarno, 2001).

Hasil KLT dinilai dengan beberapa parameter antara lain:

- a. Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan R_f/hR_f .

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}}$$

- b. Penilaian Visual

Pada penilaian visual kromatogram, hal yang dapat diamati adalah:

- 1) Jarak pengembangan komponen larutan cuplikan dibandingkan dengan jarak pengembangan larutan pembanding.
- 2) Fluoresensi/pemadaman fluoresensi (warna)
- 3) Perbandingan dan luas bercak meberikan informasi angka banding kuantitatif (Stahl, 1985).

- c. Beberapa pereaksi kimia yang dapat digunakan untuk mendeteksi kandungan kimia yang terdapat dalam fraksi aktif, antara lain:

- 1) Pereaksi sitroborat, untuk mendeteksi senyawa flavonoid. Bercak berfluoresensi kuning, kuning kehijauan dilihat di UV_{366nm} .
- 2) Pereaksi $FeCl_3$, untuk mendeteksi senyawa fenolik. Bercak berwarna abu-abu, hijau sampai biru setelah pemanasan.
- 3) Pereaksi liebermann burchard (LB), untuk mendeteksi saponin. Saponin steroid bercak berwarna biru atau hijau, untuk triterpenoid bercak berwarna merah, merah jambu, ungu/violet (Anonim, 2008).

7. Bioautografi

Bioautografi merupakan metode yang spesifik untuk mendeteksi zat yang mempengaruhi kecepatan pertumbuhan organisme uji dalam campuran kompleks. Bidang utama bioautografi adalah untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, dan antivirus yang ada di dalam ekstrak tumbuhan (Zweig dan Whittaker, 1971).

Dalam prakteknya, kromatogram diletakkan pada permukaan media agar di dalam petri yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme. Setelah zat dalam kromatogram berdifusi ke agar, lempeng diangkat dan agar diinkubasi. Setelah masa inkubasi berakhir, dapat diamati bercak yang menyebabkan hambatan pertumbuhan mikrobial uji, kemudian dicocokkan dengan hasil deteksi kromatogramnya dengan metode deteksi KLT yang sesuai. Dengan demikian dapat diperkirakan senyawa yang bertanggung jawab terhadap daya antimikroba (Zweig dan Whittaker, 1971).

E. Landasan Teori

Telah dilakukan penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol terhadap kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dengan metode *disc-diffusion*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelopak rosella terbukti mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Kandungan yang terdapat dalam tanaman ini adalah glikosida jantung, flavonoid, saponin, dan alkaloid. Zat-zat tersebut merupakan senyawa aktif dalam tanaman yang memberikan aktivitas sebagai antibakteri dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar $0,30 \pm 0,2 - 1,30 \pm 0,2$ mg/ml) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia mascences*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescense* (Olaleye, 2007).

Penelitian Borisutpeth *et al.*, 2005 menyebutkan aktivitas antibakteri ekstrak air dan alkohol *Hibiscus sabdariffa* Linn dengan metode *colorimetric micro-dilution* menunjukkan potensi dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar 4,7 mg/ml dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) sebesar 4,7 mg/ml terhadap *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae*. Penelitian Laikangbam *et al.*, 2009 menunjukkan ekstrak air dan etanol *Hibiscus sabdariffa* Linn mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas stutzeri*, dan *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* paling tinggi dibanding *medical plants* yang lain (*Cissampelos adnata*, *Cuminum cyminum*, *Oxalis corniculata*, *Piper longum* dan *Tamarindus indica*) dengan metode *disc-diffusion*. Pada penelitian ini *H. sabdariffa* memperlihatkan

aktivitas antibakteri paling tinggi adalah *Escherichia coli* dibanding *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas stutzeri* and *Klebsiella pneumonia*. Penelitian Kanbutra *et al.*, 2003 menunjukkan aktivitas antibakteri *H. sabdariffa* terhadap *E. coli* F18+ yang diisolasi mempunyai potensi tinggi dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar 4,7 mg/ml dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) sebesar 9,4 mg/ml.

F. Hipotesis

1. Ekstrak etil asetat kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*.
2. Senyawa yang memberikan aktivitas sebagai antibakteri kelopak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) adalah glikosida jantung, flavonoid, saponin, dan alkaloid.